

1985-1

REG. N^o. 316/85

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



**ANALISIS DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN 334
INDIVIDUOS (INCLUYENDO 144 PAREJAS) CON
PERDIDAS GESTACIONALES DIVERSAS**

OSCAR GONZALEZ FLORES

AGRADECIMIENTOS

A MI MADRE,
por el cariño depositado,
valor, esfuerzo y sacrificio
durante todos estos años, en
los cuales he logrado formarme.

A mi abuelita,
por entregarnos incondicion
almente su vida y con
quien he compartido mis
alegrías, tristezas y logros.

A mis hermanos,
Angélica, Lorena y Sergio,
con los que he tenido la
fortuna de crecer, la expe
riencia de querer y la satisf
acción de reír.

A la Srita. Patricia Lorena
Gómez Llanos, porque ha estad
o conmigo a lo largo de la
carrera motivándome para
seguir adelante.

A mis amigos,
los cuales siempre me han
tendido su mano en los
momentos más difíciles.

A mi Alma Mater,
por la capacitación que me
brindó, de una forma tan
completa y privilegiada.

Dr. José María Cantú,
Jefe del Depto. de Genética
de la Unidad de Investigación
Biomédica de Occidente del I.M.S.S.,
por haberme dado la oportunidad de
poder realizar esta tesis en dicho
Departamento a su muy digno cargo.

Dr. Horacio Rivera,
por su apoyo y excelente
dirección para el desarro
llo de esta tesis.

Dra. Lourdes Ramírez Dueñas,
agradezco la orientación e
instrucción que me brindó
desde el inicio de este
trabajo.

Dr. Carlos Ruiz Vallarta
porque siempre me brindó
su tiempo y ayuda.

Dr. Rubén Fragoso,
por permitirme ser su
amigo.

Dr. José Sánchez Corona,
por todas sus atencio-
nes.

Q.F.B. Bertha Ibarra Cortés,
por sus enseñanzas.

I N D I C E

Introducción	1 - 2
Historia	3 - 6
Aspectos Generales	7 - 18
Hipótesis	19
Objetivo	20
Material y Métodos	21 - 22
Resultados	23 - 25
Discusión	26 - 28
Conclusión	29
Resumen	30
Apéndice	31 - 36
Glosario	37 - 40
Bibliografía	41 - 45

INTRODUCCION.

En general, 15% de todos los embarazos reconocidos clínicamente terminan en abortos espontáneos y aproximadamente el 50-60% de éstos son cromosómicamente anormales. Dichas aberraciones son principalmente numéricas (en particular trisomías) y esencialmente de novo, es decir, el cariotipo de los padres es normal y el riesgo de recurrencia es bajo (7,30).

En un pequeño porcentaje de los casos, sin embargo, existe una aberración cromosómica (principalmente rearrreglos estructurales balanceados) en uno de los padres que determina el complemento desbalanceado de los abortos. En estos casos el riesgo de recurrencia es considerable y las parejas que han experimentado aborto recurrente muestran un aumento significativo de aberraciones cromosómicas en relación a la población general.

La posibilidad de que el aborto recurrente sea debido a anomalías cromosómicas en los padres, fué primeramente sugerida por dos reportes de mongolismo familiar. Penrose y colaboradores (19) reportaron una mujer que portaba una translocación y tuvo dos hijos con síndrome de Down y dos abortos. Forssman Lehmann (8) reportaron una translocación en un varón cuya esposa tuvo tres niños Down y cinco abortos.

Schmid (22) fué el primero en reportar resultados de análisis cromosómicos en pacientes con una historia de dos o más abortos espontáneos; entre las primeras diez parejas estudiadas se encontró un cariotipo anormal en un padre joven. Desde 1972 más de 3500 parejas con abortos múltiples (en 55 estudios) han sido examinadas (23). En estos estudios, utilizando predominantemente bandeos cromosómicos, un promedio de 7.52% de las parejas tuvieron anomalías citogenéticas (rango 0-50%).

Se han arguido diversas razones para explicar las diferentes frecuencias de aberraciones cromosómicas en pareja o individuos con pérdidas gestacionales, a saber: la dificultad en definir una pérdida gestacional, la periodicidad de los abortos, número y edad de éstos, la existencia de hijos normales o anormales, la evaluación gineco-andrológica previa, etc. Sin embargo, recientemente Lippmãñ-Hand y Veke--mans (15) concluyeron que las diferencias observadas son sólo aparentes y que la explicación más parsimoniosa es la variación propia de las muestras.

En este trabajo se presentan los resultados de los estudios citogenéticos realizados a 144 parejas y 46 individuos (31 mujeres y 15 varones) por aborto habitual y/o pérdidas gestacionales diversas (PGD), ésto es mortinatos, muertes perinatales, productos malformados, etc.

HISTORIA.

A mediados del Siglo XIX se había establecido la universalidad de la división celular como el fenómeno central en la reproducción de los organismos y Virchow lo expresó en su famoso aforismo "Omnis cellula - cellula". A partir de entonces comienza a producirse la convergencia entre el estudio de las células y de la herencia y evolución como fuera expuesto con suma exactitud por Wilson. "La herencia aparece como una consecuencia de la continuidad genética de las células establecida por la división".

Las observaciones realizadas por Van Benden, Flemming, Strasburger, Boveri y otros sobre la célula germinal sirven de base a la célebre teoría de la continuidad del plasma germinativo, propuesta por Weissman en 1883. Esta teoría establece que la transmisión de los factores hereditarios de una generación a otra tiene lugar por medio de la continuidad de lo que él denominó plasma germinativo, localizado en los elementos sexuales (espermatozoides y óvulo), y no mediante las células somáticas.

Las leyes fundamentales de la herencia fueron descubiertas por Gregorio Mendel en 1865; pero en esa época no se conocían suficientemente bien los cambios producidos en las células sexuales como para llegar a una interpretación de la segregación independiente de los caracteres hereditarios.

Por esa y por otras razones, los estudios de Mendel cayeron en el olvido, hasta que los botánicos Correns, Tschermack y De Vries, en 1900, redescubrieron independientemente las leyes de Mendel.

En ese momento la citología había avanzado lo suficiente como para comprender y explicar el mecanismo de distribución de las unidades hereditarias postulado por Mendel. Además, los citólogos observaron que el ciclo que experimentan los cromosomas en la meiosis de las células germinativas estaba relacionado con los fenómenos hereditarios.

En relación directa con estos descubrimientos, McClung (1901-1902) sugirió que la determinación del sexo estaba vinculada con ciertos cromosomas especiales, lo cual fué corroborado por Stevens y Wilson (1905). La demostración experimental de la teoría cromosómica de la herencia corresponde a Morgan y sus colaboradores, Sturtevant y Bridges, quienes asignaron a los genes (Johnassen) o unidades hereditarias la localización dentro de los cromosomas. A partir de ese momento la investigación experimental de la herencia y evolución hizo que ésta se separara como una rama de la biología, que en 1906 Bateson bautizó con el nombre de genética. Sin embargo, la ciencia de la genética casi desde el principio mantuvo íntima relación con la citología, y de la convergencia de ambas, se originó la citogenética. En la última década el estudio de la genética se ha unido al de

la bioquímica, alcanzando el nivel molecular y estableciendo se de ese modo los nuevos campos de la genética bioquímica y molecular.

Por más de medio siglo los citogenetistas habían estudiado los cromosomas de las plantas y de los invertebrados y relacionado las anomalías numéricas y estructurales de los cromosomas con las características que transmiten, hicieron posible que dejara de ser motivo de debate el papel de los cromosomas como portadores de los genes.

Aunque se había intentado estudiar los cromosomas humanos desde mucho antes, es posible que fueran observados por primera vez con células tumorales por Arnold en 1879. Hansmann, en 1891 y Flemming, en 1898, trataron de determinar el número normal de cromosomas en el hombre, pero debido a lo rudimentario de sus procedimientos, sólo pudieron sugerir que eran aproximadamente 24. Estudios efectuados posteriormente con el mismo fin mencionaban las cifras de 24 y 38, inclinándose la mayor parte de los investigadores por 24 cromosomas.

Winiwarter, en 1912, usando técnicas más perfeccionadas, encontró 47 cromosomas en material tisular y 48 cromosomas en tejido ovárico, y sugirió que, en el hombre, el mecanismo de determinación del sexo era del tipo XO/XX. Nueve años más tarde, Painter demostró la presencia del cromosoma Y en espermatoцитos primarios y concluyó que el número diploide

de cromosomas era de 48 en ambos sexos.

Fué en 1959 cuando Tjio y Levan trabajando con fibroblas to de pulmón de embriones cultivados en líquido amniótico - bovino, determinaron definitivamente que el número normal de cromosomas de la especie humana en las células somáticas es de 46, y describieron algunas características morfológicas de los mismos ... "Los cromosomas con metafase, con contracción moderada por la colchicina varía en longitud entre 1 y 8 micras, pero la amplitud total de variación es de 1 a 11 micras.

ASPECTOS GENERALES.

En el núcleo celular existe una substancia fundamental - llamada carioplasma que forma un número fijo de cuerpos semejantes a filamentos llamados cromosomas. Dichos organelos - están compuestos de ADN y proteínas y contienen las unidades hereditarias o genes. En una célula que no se divide, los - cromosomas generalmente aparecen como una red irregular de - hebras y gránulos denominada cromatina. Antes de la divi--- sión nuclear, estas hebras se condensan en cromosomas compac- tos, en forma de bastones, que se distribuyen posteriormente a las dos células hijas en números exactamente iguales. Cada tipo de organismo tiene un número característico de cromosomas en cada una de las células constitutivas. El cariotipo humano está constituido por 46 cromosomas (Tjio y Levan, - 1956), formado por 23 pares de homólogos (44 autosomas mas - los cromosomas sexuales que en el varón son XY y en la mujer XX). Los cromosomas difieren en forma, longitud y presencia de nudos o constricciones a lo largo de los mismos (31).

Una célula con dos series completas de cromosomas se dice que es diploide. El espermatozoide y el óvulo que solo - tiene un miembro de cada par de cromosomas (una serie comple- ta de cromosomas), se dice que son haploides, es decir, tienen exactamente la mitad de cromosomas que las células somá- ticas de la misma especie. Cuando el óvulo es fecundado por

el espermatozoide, se unen las dos series haploides de cromosomas y se restaura el número diploide.

El funcionamiento normal del sistema genético se mantiene por la constancia del material hereditario presente en los cromosomas.

En ciertas condiciones puede haber cambios en el cariotipo con diversas consecuencias genéticas, alteraciones que generalmente son denominadas aberraciones cromosómicas.

CLASIFICACION DE LAS ABERRACIONES CROMOSOMICAS.

Las anomalías de los cromosomas son de dos tipos, numéricas y estructurales y afectan ya sea a los autosomas o a los cromosomas sexuales (gonosomas) o, raramente, a ambos en el mismo cariotipo (6,29).

- Aberraciones Numéricas.

Estas se originan sobre todo a través del proceso de no disyunción (fallo de los cromosomas apareados o de las cromátidas hermanas en experimentar disyunción en la anafase, sea una división mitótica o en la primera o segunda división meiótica). Una variedad de no disyunción es el rezago anafásico que ocurre cuando los miembros de un par cromosómico no verifican la sinapsis y por consiguiente, no se se-

para del modo habitual a lo largo del huso; el resultado de este tipo de no disyunción provoca que un miembro de un par no llegue a incluirse en ninguna célula hija (Fig. 1).

Cualquier cantidad que sea un múltiplo exacto del número haploide ($1n$) es euploide. Los números euploides no son necesariamente normales; pero el cariotipo se presenta equilibrado. Los números cromosómicos como $3n$ y $4n$ que son múltiplos exactos de n y superiores a $2n$ denominan poliploides.

Cualquier número que no sea un múltiplo de n es aneuploide, estado que implica ganancia o pérdida de uno o más cromosomas. Algunos tipos de aneuploides son trisómicos, con $2n+1$ cromosoma y tres miembros de un cromosoma determinado, otros monosómicos, con $2n-1$ cromosomas y sólo un miembro de uno de los cromosomas; otros aún trisómicos dobles ($2n+1+1$), con un miembro adicional en cada uno de dos pares de cromosomas, así sucesivamente.

- Aberraciones Estructurales.

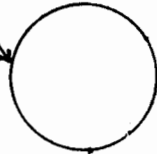
Son consecuencia de una o más rupturas cromosómicas seguidas de reconstrucción según una combinación anormal. Las rupturas de los cromosomas se verifican normalmente con una frecuencia baja y pueden ser estables (es decir, capaces de salir inmodificadas de la división celular) o inestables.

Los tipos estables son: Deleciones, Duplicaciones, In--

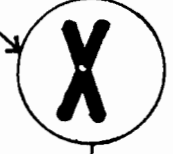
Primera
división
meiósica



No disyunción



Normal



Segunda
división
meiósica

Normal

Normal

Normal

No disyunción

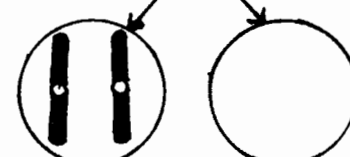
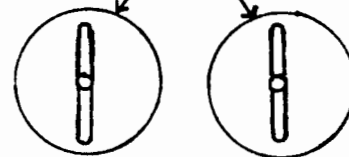
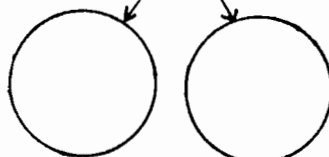
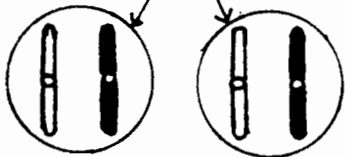


Fig. 1. No disyunción durante la primera y segunda división meiósica. La no disyunción durante la -meiosis. La meiosis I produce gametos que o bien contienen ambos miembros del par de cromosomas ho mólogos en cuestión, o ningún miembro de estos cromosomas. La no disyunción durante la meiosis II -origina gametos que contienen (o en los que faltan) dos cromosomas idénticos, derivados ambos de un mismo miembro del par homólogo. En los organismos usados en los trabajos experimentales, y es probable que también ocurra en el hombre, se ha comprobado que la no disyunción ocurre con mucho mayor frecuencia en la meiosis I que en la meiosis II. Los gametos en que falta un cromosoma (distinto -del X) son, al parecer, incapaces de formar un cigoto viable.

versiones, Translocaciones, Inserciones e Isocromosomas.

Los tipos inestables no superan la división celular normal, y son: Dicéntricos, Acéntricos y Anillos.

Delección o Supresión:

Es la pérdida de un fragmento de un cromosoma, sea terminal o consecuencia de una simple ruptura, o lo que es más frecuente intersticialmente entre dos rupturas. La porción-suprimida se llama fragmento acéntrico cuando carece de centrómero, lo que determina que dicho fragmento no se desplace a lo largo del huso y se pierda en la división siguiente. En el cromosoma afectado falta toda la información genética que estaba almacenada en el fragmento perdido.

Algunas delecciones originan un cromosoma anular (Fig.2). El cromosoma en anillo es la consecuencia de un tipo de delección en que se ha perdido ambos extremos y los dos extremos rotos se han soldado para formar un anillo. Si posee un centrómero, un cromosoma en anillo es capaz de replicación y es posible que experimente alteraciones estructurales.

Duplicación:

Es la presencia de un fragmento adicional de un cromosoma que en general se origine por un entrecruzamiento desigual.

Los fragmentos duplicados llegan a ser libres, con un

centrómero propio, o bien, incorporarse a un cromosoma del complemento normal.

Si el fragmento incluye el centrómero, se puede agregar como un pequeño cromosoma extra. En general las duplicaciones son menos nocivas que las Deleciones. De hecho las duplicaciones pequeñas constituyen un mecanismo evolutivo para la adquisición de nuevos genes.

Inversión:

La inversión implica la fragmentación de un cromosoma por dos rupturas, seguida de reconstitución del fragmento, el cual sufre una inversión de 180° entre las rupturas (Fig. 3). Si la inversión sobreviene en un único brazo cromosómico es paracéntrico (junto al centrómero), pero si comprende la región del centrómero, es pericéntrica (alrededor del centrómero).

Como las inversiones dificultan el apareamiento entre cromosomas homólogos en estado heterocigoto, el entrecruzamiento genético puede quedar suprimido entre ellos. Esto daría lugar a que una especie retenga grupos de genes, que se comportan como unidades. En consecuencia, las inversiones son de importancia evolutiva.

En general, un cambio en el orden de los genes provocado por inversión no conduce a un fenotipo anormal.

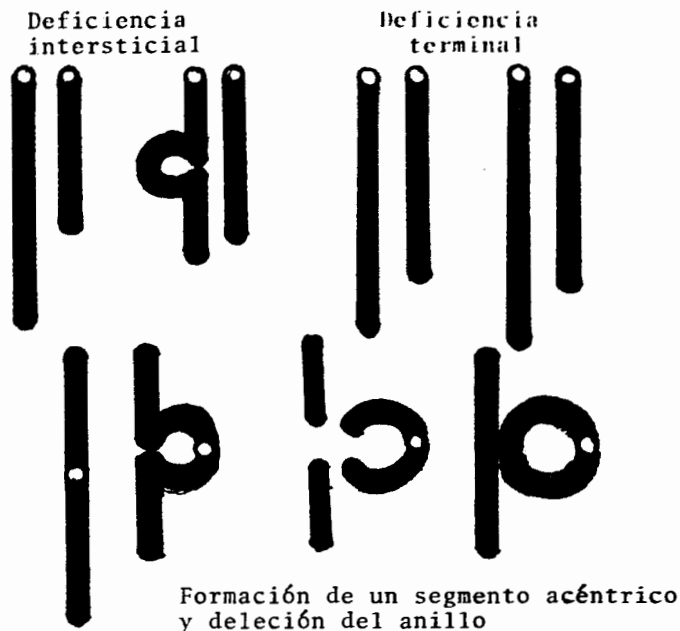


Fig. 2. Esquema que ilustra el origen de una deficiencia intersticial (a la izquierda arriba) y de una terminal (a la derecha arriba). Abajo se aprecia el mecanismo que origina un cromosoma deficiente anular con centrómero y un fragmento acéntrico (sin centrómero) que se pierde.

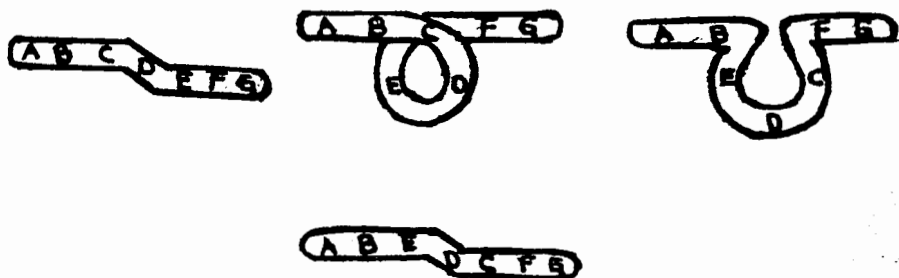


Fig. 3. Mecanismo mediante el cual se pueden producir las inversiones cromosómicas. Si un cromosoma en la profase de una división celular se dobla en forma tal que se forme un círculo y que se rompan dos extremos, los dos extremos rotos se pueden unir, colocando las partes incluidas dentro del círculo, en orden invertido en comparación con el cromosoma original.

Translocación

Es la transferencia de parte de un cromosoma a otro. Este proceso requiere la ruptura de ambos cromosomas, con reparación según una distribución anormal. A menudo, pero no siempre, las translocaciones son recíprocas. Tales translocaciones son de dos tipos; homocigotas y heterocigotas (Fig. 4). No es indefectible que una translocación provoque un fenotipo anormal pero al igual que las inversiones, las translocaciones conducen a la formación de gametos desequilibrados y por ello implican un riesgo de descendencia anormal.

Las translocaciones Robertsonianas son un tipo especial en el que las rupturas se verifican en los centrómeros y se intercambian brazos cromosómicos enteros. Este proceso se denomina fusión céntrica. En el hombre, estas translocaciones ocurren entre dos cromosomas acrocéntricos (Fig. 5).

Inserción:

Se trata de un tipo de translocación en que un segmento cromosómico en un punto distinto se inserta, sea del mismo o de otro cromosoma. Este proceso requiere tres rupturas y es relativamente raro.

Isocromosomas:

El centrómero de un cromosoma puede dividirse en el curso de una mitosis en dirección perpendicular a su eje longi-

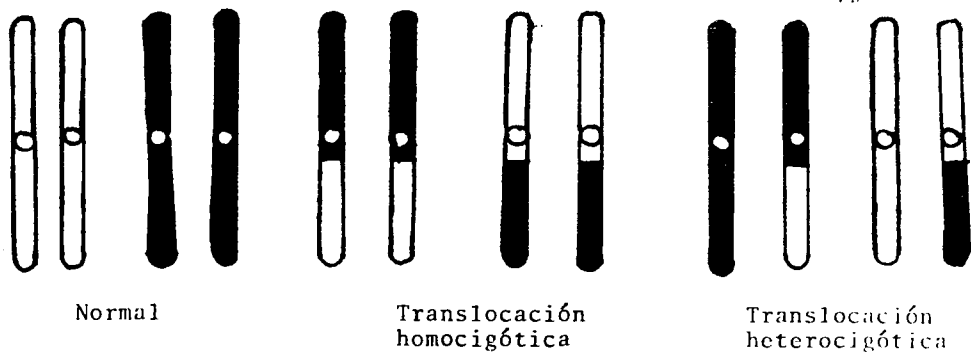


Fig. 4. Representación esquemática homocigótica y heterocigótica en comparación con la disposición normal.

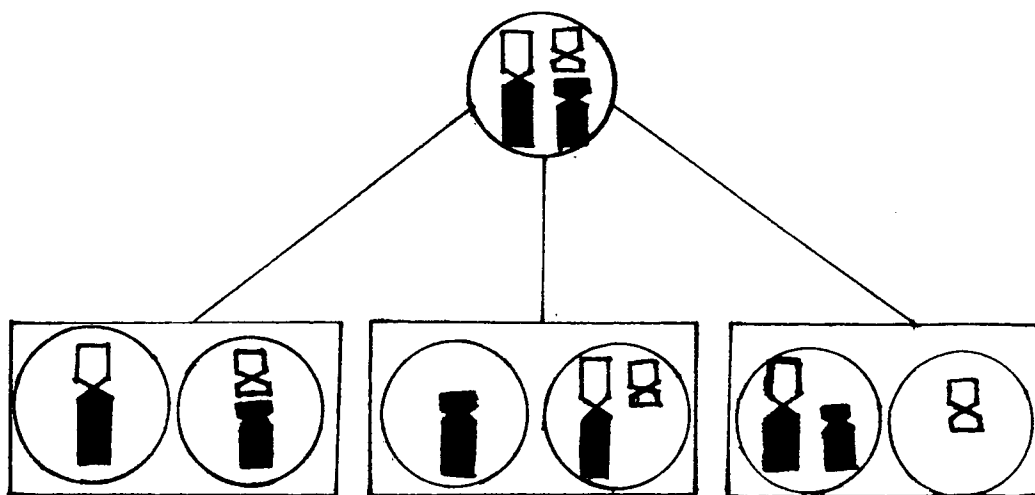


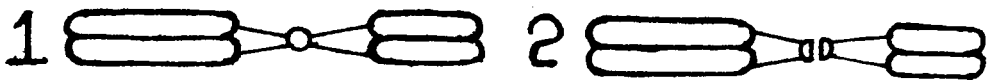
Fig. 5. Gametogénesis de un portador de una translocación robertsoniana de los brazos largos del cromosoma 14 (en negro) y el cromosoma 21 (en blanco).

tudinal en lugar de hacerlo paralelamente al cromosoma - - (Fig. 6). Si este error de división ocurre en un centrómero submediano, el cromosoma, en lugar de producir dos mitades idénticas da lugar a la formación de dos elementos denominados isocromosomas, uno largo y otro corto, ambos con centrómeros metacéntricos. Los isocromosomas son en parte duplicaciones y en parte deleciones de los cromosomas normales.

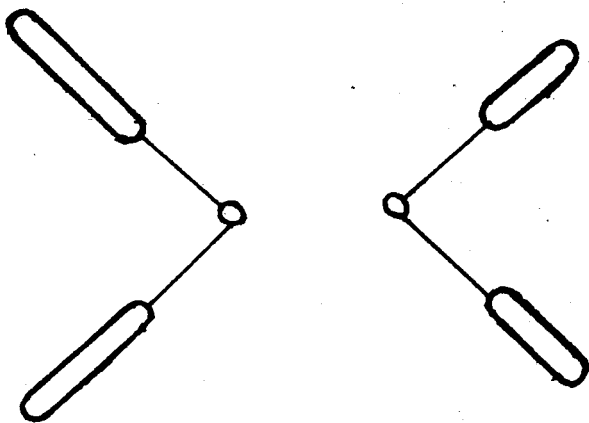
MIXOPLOIDIAS (Mosaicos de cromosomas).

Si hay o no disyunción durante la gametogénesis, el gameto con el número heteroploide de cromosomas origina un cigoto, todas las células del embrión tendrán el mismo número de cromosomas. No obstante, si la falta de disyunción se verifica durante una de las divisiones iniciales del cigoto, el niño puede poseer dos o más linajes de células con número cromosómico distinto.

Un mosaico de cromosomas equivale a la dotación de un mínimo de dos líneas de células de diferente cariotipo y derivadas de un solo cigoto. Los mosaicos son numéricos o estructurales. Se han descrito diferentes mosaicos, en su mayoría poseen líneas celulares con distinto número de cromosomas sexuales. Algunos mongólicos presentan células con 46 y 47 cromosomas mezcladas en los tejidos.



3



4

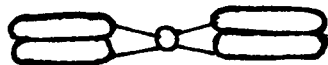
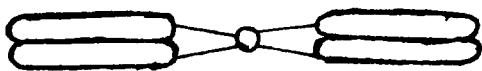


Fig. 6. Esquema que ilustra la formación de isocromosomas. 1. Cromosoma original; 2, ruptura a nivel del centrómero, - en el comienzo de la anafase mitótica; 3, las cromátidas se separan en dos isocromosomas; 4, en la división siguiente - se encuentran dos isocromosomas completos. Obsérvese que - cada brazo tiene la misma constitución genética.

La proporción de células normales y anormales varía de un tejido a otro en un mismo enfermo, así como en los diferentes enfermos.

HIPOTESIS.

La frecuencia de anormalidades cromosómicas en parejas con pérdidas gestacionales diversas (PGD) en esta población es mayor que la población general.

OBJETIVO.

Conocer la frecuencia y el tipo de aberraciones cromosómicas en parejas que consultan por aborto o pérdida gestacional diversa en nuestra población.

MATERIAL Y METODOS.

La población estudiada comprendió todos los pacientes - referidos a la División de Genética de la Unidad de Investigación Biomédica, Centro Médico de Occidente del I.M.S.S., - de marzo de 1977 a septiembre de 1984, en razón de aborto - habitual y/o PGD (óbitos, productos malformados y/o muertes perinatales), independientemente de si tenían o no hijos sa nos. Una evaluación gineco-obstétrica previa había sido - realizada en la mayoría de los casos.

Considerando la historia reproductiva al tiempo del estudio, los pacientes se clasificaron en los siguientes 4 - grupos:

- I. 63 parejas y 25 individuos (19 mujeres y 6 varones) - con 2 o más abortos solamente.
- II. 24 parejas y 3 individuos (2 mujeres y 1 varón) con - 2 o más abortos y al menos 1 hijo normal.
- III. 41 parejas y 16 individuos (8 mujeres y 8 varones) - con 1 o más PGD.
- IV. 16 parejas y 2 mujeres con 1 o más PGD y al menos 1 - hijo normal.

El análisis citogenético se llevó a cabo en preparacio-

nes obtenidas de cultivos convencionales de linfocitos. Rutinariamente se utilizó la tinción para bandas G (28,5); en casos particulares se utilizaron técnicas adicionales tales como bandas C (27) y tinción para organizadores nucleolares (I) (detalle de las técnicas en apéndice). Se analizaron microscópicamente un mínimo de 12 metafases por individuo, excepto en los casos de mosaicismo, en quienes se examinaron al menos 50 células.

Los polimorfismos cromosómicos (variaciones de la heterocromatina constitutiva y de los brazos cortos de los acrocéntricos) no fueron considerados debido a que en gran medida están sujetos a interpretación personal y subjetiva.

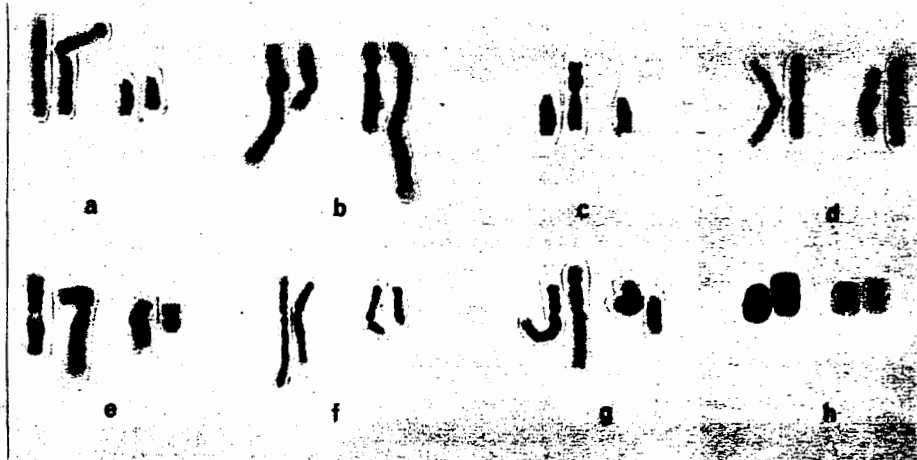
El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba t de student para comparación de porcentos.

RESULTADOS

Siete de las 175 mujeres (4.00%) y 8 de los 159 varones (5.03%) presentaron una aberración cromosómica; es decir, el 4.49% de los individuos fueron cromosómicamente anormales. La diferencia entre las frecuencias de ambos sexos no fué estadísticamente significativa. En las 144 parejas en que ambos miembros fueron estudiados, se encontraron 14 anomalías (9.72%). Las aberraciones diagnosticadas fueron 8 traslocaciones recíprocas, 2 traslocaciones Robertsonianas, 2 mosaicos para el cromosoma X, una inversión pericéntrica, un sitio frágil y un anillo no identificado en mosaico (Tabla 1, Fig. 7). No hubo ninguna instancia donde los 2 miembros de una pareja tuvieran cariotipos anormales. Además, las anomalías se encontraron, con una excepción, en los 249 individuos de los grupos I y III; ésto es, en aquellos que no habían tenido hijos normales. Tal frecuencia (5.62%) es significativamente diferente ($p < 0.02$) de la observada en los 85 individuos de los grupos II y IV (1.18%).

TABLA 1. ANORMALIDADES CROMOSOMICAS
OBSERVADAS EN ESTE ESTUDIO.

Grupo I	46,XY,t(1;13)(p36;q22)	
	46,XX,t(2;5)(q11;q35)	
	45,XY,-13,-14,+t(13q14q)	
	46,XX/46,XX,fra(17)(p12)	(90%/ 10%)
	46,XX/47,XXX	(98%/ 2%)
Grupo II	Ninguna	
Grupo III	46,XX,t(2;7)(q36;q21)	
	46,XY,t(3;8)(q25;p23)	
	46,XX,t(11;18)(q22;p11)	
	46,XY,t(11;18)(q24;q12)	
	46,XY/46,XY,t(3;4)(q22;q35)	(7%/93%)
	45,XY,-13,-14,+t(13q14q)	
	46,XY,inv(22)(p13q12.2)	
	45,X/46,XX	(6%/ 94%)
46,XY/47,XY,+r?	(91%/ 9%)	
Grupo IV	46,XX,t(8;16)(p23;p11.2)	



PIE DE FIGURA

Fig. 7. Algunas de las aberraciones estructurales encontradas (bandas G). a: $t(1;13)(p36;q22)$; b: $t(2;5)(q11;q35)$; - - c: $t(13q14q)$; d: $t(3;8)(q25;p23)$; e: $\bar{t}(11;18)(q24;q12)$; - - f: $t(2;7)(q36;q21)$; g: $t(8;16)(p23;p11.2)$, y h: $inv(22)(p13q12.2)$; el par a la derecha con tinción para organizadores nucleolares.

DISCUSION

La frecuencia de aberraciones cromosómicas en este estudio es semejante al promedio de 7.52% en parejas (3.76% de individuos) informado en la literatura (15, 23). La mayoría (12/15) de dichas aberraciones fueron rearrreglos estructurales (principalmente translocaciones), hallazgo también similar a los de otras series (30, 18). A este respecto cabe señalar que diversos estudios citogenéticos de los productos conceptuales perdidos por padres portadores (23, 14, 35) han demostrado que son precisamente los rearrreglos estructurales parentales la principal causa genética del aborto habitual y de otras pérdidas gestacionales. Aunque en este estudio no se hicieron los cariotipos de los productos perdidos, los desbalances posibles por segregación o recombinación de las aberraciones estructurales encontradas serían en su mayoría difícilmente compatibles con sobrevivencia postnatal; es decir, la probabilidad de diagnosticarlos a través de un recién nacido sería muy baja.

El riesgo para los portadores balanceados de translocaciones de tener pérdidas gestacionales y/o procrear un hijo con un desbalance secundario a la alteración parental, es siempre mayor que el de la población general aunque variable. Entre los factores que lo determinan se pueden mencionar el sexo del portador, los cromosomas participantes, el tamaño-

y la viabilidad de los desbalances posibles y la segregación en meiosis (12, 25). Globalmente, sin embargo, el riesgo de aborto para un portador de una translocación es del 25% (32). Similarmente, el riesgo para portadores de inversiones pericéntricas dependerá de varios factores, tales como el tamaño relativo del segmento invertido en relación a la recombinación genética y la viabilidad de las aneusomías resultantes (4). Incidentalmente, conviene señalar que los portadores de la $inv(22)(p12q13)$ tienen un riesgo alto de procrear hijos con malformaciones severas por aneusomía de recombinación (3, 9). Además, esta inversión puede ser considerada un marcador etnológico propio del estado de Jalisco ya que su ocurrencia es rarísima (21) y dado que ha sido previamente identificada en 2 familias de origen jalisciense no emparentadas (3, 9).

La frecuencia de mosaicismos para el cromosoma X encontrada en el presente trabajo debe ser considerada como un mínimo, dado el número de metafases rutinariamente analizadas y considerando que la probabilidad de diagnosticar un mosaico es proporcional al número de células estudiadas. A este respecto, es bien conocido por ejemplo, que un análisis inicial de solo 11 células permite el diagnóstico del 95% de los mosaicos con una línea presente en al menos 25% de las células. Referente a la significancia de dichos mosaicismos, el consenso general es que las portadoras tienen un riesgo muy ele

vado (aproximadamente 75%) de pérdidas gestacionales e hijos cromosómicamente y/o físicamente anormales, aún cuando la proporción de las líneas anormales sea pequeña (24-17). Sin embargo, los resultados de Reinisch et al (20) contradicen dicha aserción.

El tipo de relación entre sitios frágiles autosómicos, en particular fra(12)(p12), y aborto habitual es incierto (30, 18); no obstante, el carácter usualmente hereditario de dichas anomalías, así como el desconocimiento de su frecuencia en la población general, más probablemente apuntan hacia una asociación fortuita.

Finalmente, la distribución de las anomalías citogenéticas de acuerdo a los 4 grupos definidos en Material y Métodos, indica que la probabilidad de encontrar una aberración cromosómica parental es mayor cuando no existen hijos normales (34, 2). Además, dicha probabilidad parece ser todavía mayor cuando la pareja ha tenido, además de abortos o como única anomalía, óbitos y/o productos malformados (23).

CONCLUSION.

En conclusión, la frecuencia de aberraciones cromosómicas en las 144 parejas del presente estudio concuerda con la observada en otras series y se podría estimar, grosso modo, de 1/10, lo que subraya la necesidad del estudio citogenético en la investigación etiopatogénica de las pérdidas gestacionales.

RESUMEN.

La evaluación citogenética de 334 individuos (incluyen do 144 parejas) con abortos repetidos y/o pérdidas gesta- cionales diversas demostró una aberración cromosómica en - 15 de los individuos (4.49%) y en 14 de las parejas (9.72%). La comparación de la frecuencia de anormalidades en indivi duos que no habían procreado hijos normales contra aquella de los que sí lo habían hecho (5.6% vs. 1.18%) reveló una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.02$). Es- tos datos apoyan la conveniencia de efectuar estudios cito genéticos parentales en la investigación etiológica de pér didas gestacionales, particularmente cuando no ha habido - descendencia normal. Tanto los resultados obtenidos como el tipo de anormalidades observadas (8 translocaciones re- cíprocas, 2 translocaciones Robertsonianas, 2 mosaicos pa- ra el cromosoma X, 1 inversión pericéntrica, 1 sitio frá- gil y 1 anillo no identificado) fueron similares a los ob- tenidos por otros autores.

APENDICE.

El reconocimiento de las bandas ha permitido una mejor identificación de los cromosomas o de sus partes. Además - de los telómeros, centrómeros y brazos, se han seleccionado bandas especiales para establecer límites que permiten subdividir los brazos en regiones. Estas se denominan 1, 2, - 3 y 4, desde el centrómero hasta el telómero. Utilizando - la nomenclatura establecida en la conferencia de París - - (1971), se puede identificar cualquier banda o segmento del cromosoma siguiendo estos parámetros: número de cromosoma, - símbolo para el brazo (p=corto, q=largo) y región y número de banda. Por ejemplo: 6p23, indica banda 3 en la región 2 del brazo corto del cromosoma 6.

Con el uso del bandeo G y Q se han podido identificar 320 bandas por conjunto haploide en la metafase. Siguiendo la mitosis en la profase tardía y prometafase, el número de bandas aumentó hasta 1256.

PREPARACION DE LOS CROMOSOMAS PARA SU ESTUDIO.

El estudio de los cromosomas debe efectuarse en células obtenidas de un tejido adecuado y las células vivas más accesibles se hallan en la sangre circulante. Las células - sanguíneas utilizadas deben ser leucocitos, pues los hematíes maduros carecen de núcleo y, por consiguiente, de cromoso-

mas.

EXTRACCION DE LA MUESTRA.

Se obtiene una muestra de sangre (2.5ml) a la que se le añade heparina (0.1ml) para evitar que coagule.

CULTIVO DE LINFOCITOS.

- Colocar un medio de cultivo McCoy (8 ml) a la que se le añade una gota de antibiótico.
- Se estimula la división del tejido por la acción de un agente mitogénico como la fitohemeglutinina (7 gotas).
- Se agrega sangre periférica (1.5ml) y se incuba al cultivo hasta que la división de las células resulta evidente, lo que suele requerir 72 Hrs. a 37°C.

COSECHA.

- Después de la incubación, agregar una solución muy diluída de colchicina (2 gotas) cuando las células se multiplican activamente; con ello se dificulta la acción del huso y se impide la división de los centrómeros. La colchicina detiene la mitosis cuando ésta llega a la metafase, y ello determina la acumulación de las placas en el medio de cultivo.
- Una vez puesta la colchicina se incuba a 37°C durante una hora y media, depositar en tubos de centrifuga y centrifugar por 10 minutos a 1200 rpm.

- Decantar y resuspender el botón y agregar poco a poco una solución hipotónica (KCl), para hinchar las células y separar las cromátides; los centrómeros quedan intactos, incubar a 37°C por 15 minutos.

- Centrifugar a 1200 rpm, durante 10 minutos, resuspender, agregar la solución fijadora hasta un volumen de 10 ml. y dejar en reposo de 15 a 20 minutos.

- Centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos, decantar y - - agregar 5ml de solución fijadora.

- Centrifugar a 1200 rpm, durante 10 minutos, decantar y - - agregar 3 ml. de solución fijadora.

- Centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos, decantar y - - agregar solución fijadora de acuerdo al botón, se extienden las células sobre un porta objetos y se tificen; con ello ya se encuentran preparadas para efectuar el examen microscópico de las mismas y obtener su fotografía.

- Se separan los cromosomas individuales de la imagen fotográfica, se agrupan por pares y se montan en un cartón de acuerdo con la clasificación de Denver. Este proceso suele denominarse cariotipificación, y el cuadro completo es el cariotipo.

Los cromosomas se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo con su forma, la que a su vez depende de la posición del centrómero (sitio donde se fijan las fibras del huso durante la mitosis) que divide al cromosoma en sus dos brazos.

El cromosoma telocéntrico presenta el centrómero de uno de sus extremos; el acrocéntrico tiene un brazo muy corto; el submetacéntrico tiene brazos de distinto largo y en el metacéntrico los brazos son iguales.

Durante la anafase los cromosomas se doblan en la región del centrómero, de tal manera que los metacéntricos aparecen en forma de "V", mientras que los acrocéntricos mantienen su forma cilíndrica. La desviación angular de los cromosomas también puede verse en la metafase, siempre que no se use colchicina.

Bandeado G. Una de las técnicas más usadas es la del colorante de Giemsa (usado antes para la coloración de extendidos de sangre). Las bandas que se tiñen con Giemsa se denominan bandas G⁸. Tanto las bandas Q como las G se relacionan con los cromómeros que se observan en el leptonema y paquinema de la meiosis. Esto significa que las bandas representan una subdivisión fundamental del cromosoma⁹.

Sobre la base del tipo de bandeo se pueden distinguir tres tipos de cromatina: heterocromatina constitutiva centromérica, heterocromatina intercalada y eucromatina. El bandeo Q y G se corresponde en general con la heterocromatina intercalada.

Técnica para banda G tripsina.

1. Sumergir las laminillas en solución de tripsina de 10 a-

20 segundos.

2. Lavar sucesivamente en dos soluciones de PBS.
3. Teñirlas con Giemsa por espacio de 3 a 5 minutos.

Bandeado C. Ciertos tratamientos que desnaturalizan el ADN, seguidos por Giemsa, dan como resultado una intensa coloración de la región centromérica, correspondiente al primer tipo de heterocromatina mencionado. Esto se debe a la existencia de un ADN satélite en esa región, que está compuesta por secuencias de nucleótidos muy repetitivos y que se renaturalizan rápidamente. También se colorean las constricciones secundarias de los cromosomas 1, 9 y 16 y el segmento distal del cromosoma Y. Este método ha demostrado el hecho interesante de que hay polimorfismo en los cromosomas humanos (Sánchez y Yunis, 1977). En efecto, el tamaño de las bandas C puede variar de un individuo a otros, lo que está relacionado con la cantidad variable de ADN satélite.

Técnica para Bandas C.

1. Sumergir las laminillas en solución de HCl 0.1 N durante 15 minutos.
2. Lavar con H₂O destilada.
3. Sumergir las laminillas en Ba(OH)₂ 0.1 N a 37°C durante 1 hora.
4. Lavar con H₂O destilada.

5. Sumergir las laminillas en solución de SSC a 65°C en baño maría por una hora.
6. Lavar con H_2O destilada.
7. Tefir con Buffer-Giensa al 2% durante 3 a 5 minutos.

ORGANIZADORES NUCLEOLARES.

Solución AgI (4grde Ag NO_3 disueltos en 8ml de H_2O desionizada).

Solución AgII (4gr de Ag NO_3 en 5ml de H_2O destilada y - 7.5 ml. de NH_4OH . Al 3% (neutralizada con acetato de sodio).

PROCEDIMIENTO.

4 gotas de la solución AgI son puestas sobre la laminilla y se montan con el cubre objetos. Esta laminilla se pone abajo foco 5 minutos (Durotex) (hasta que se establece el nitrato de plata al dividir la laminilla), después lavar con agua destilada.

Secar la laminilla al aire y agregar dos gotas de AgII y dos gotas de formalina y se cubre inmediatamente con el cubre objetos, esperar unos segundos hasta que la laminilla tome un color amarillo pálido e inmediatamente lavar en agua corriente.

Secar al aire y observar.

GLOSARIO

- Aberración cromosómica.** Disposición anormal de partes de un cromosoma causadas por el rompimiento y la reunión de las mismas.
- Anafase.** Es la etapa de la división nuclear durante la cual los cromosomas hijos pasan de la placa ecuatorial hacia los polos opuestos de la célula (los extremos del huso). La anafase sigue a la metafase y procede a la telofase.
- Aneuploide.** Organismo o célula con un número cromosómico que no es múltiplo exacto del número aploide (n) o básico, hiperploide mayor (por ejemplo $4n + 1$); hipoploide = menor (por ejemplo, $4n-1$).
- Autosómico.** Par de cromosomas ordinarios que se distingue del cromosoma sexual. El hombre posee 22 pares de cromosomas autosómicos.
- Cariotipo.** Hacer una caracterización de un conjunto de cromosomas de un individuo con relación a su número, tamaño y forma.
- Centrómero.** Pequeña masa de cromatina situada en el interior de un cromosoma y a la que se unen las dos cromátidas. El centrómero ocupa una posición característica en todo cromosoma que se divide y por medio de la cual se fija al huso.
- Cigoto.** Célula producida por la unión de dos células sexuales.

les maduras (gametos) en el proceso de reproducción; también utilizado en genética para designar al individuo que se desarrolla a partir de este tipo de célula.

Cromátide. Durante la profase y metafase se pueden observar los cromosomas formados por dos filamentos paralelos unidos por centrómero. Cada filamento es una cromátide. Un cromosoma de un solo filamento replica durante el período sintético del ADN en el ciclo celular y es entonces cuando aparece compuesto por dos cromátides hasta la siguiente división mitótica, en la cual cada cromátide representa el cromosoma de una célula hija.

Cromatina. Porción fácilmente teñible del núcleo celular, que forma una red de fibrillas en el interior del mismo; compuesto de ADN y proteínas.

Cromosoma. Cuerpos filamentosos o en forma de bastón en el núcleo de las células que contienen las unidades hereditarias, los genes.

Diploide. Que tiene el número doble de cromosomas que un gameto; que posee dos series de cromosomas.

Entrecruzamiento. Proceso inferido genéticamente por nuevas asociaciones de partes de cromosomas. Resulta en un intercambio de genes y produce por lo tanto combinaciones que difieren de las características de los progenitores. El término entrecruzamiento gené

tico puede ser aplicado a nuevas combinaciones de genes.

Fenotipo. Totalidad de la naturaleza física, bioquímica fisiológica de un individuo, tal como viene determinada por su genotipo y el ambiente dentro del cual se desarrolla. En sentido más limitado, la expresión de algún gen o genes en particular clasificada con cierta norma.

Haploide. Número de cromosomas de un gameto normal que solo contiene un miembro de cada par de cromosomas en el hombre, el número haploide es 23.

Heterocigoto. Que posee dos alelos diferentes para un carácter dado en el locus correspondiente de cromosomas homólogos.

Homocigoto. Organismo cuyos cromosomas portan miembros idénticos de cualquier par de genes. Por lo tanto, los gametos son todos similares respecto a este locus y los individuos serán de una línea pura.

Meiosis. Tipo de división nuclear, generalmente dos divisiones celulares sucesivas, que da lugar a células hijas con el número haploide de cromosomas o sea, la mitad del número correspondiente a la célula original.

Mitosis. Forma de división celular o nuclear por medio de la cual cada uno de los dos núcleos hijos reciben exactamente el mismo complemento de cromosomas que-

tenía el núcleo progenitor.

No disyunción. Incapacidad de separarse de miembros de un par de cromosomas durante la anafase de la división celular, por lo que ambos pasan a la misma célula - hija.

Segregación. Separación durante la meiosis de los cromosomas paternos de los maternos con la consecuente separación de los alelos y de sus diferencias fenotípicas, observadas en la progenie.

BIBLIOGRAFIA.

1. Bloom, S.E. and Goodpasture, C.: An improved technique for silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. Hum. Genet. 34: 199, 1976.
2. Blumberg, B.D., Shulkin, J.D., Rotter, J.I., Mohamdas, T. and Kaback, M.M.: Minor chromosomal variants and major chromosomal anomalies in couples with recurrent-abortion. Am. J. Hum. Genet., 34:948.
3. Cantú, J.M., Hernández, A., Vaca, G., Plascencia, L.,- Martínez-Basalo, C., Ibarra, B. and Rivera, H.: Trisomy 22q12- qter: "aneusomie de recombinaison" of a pericentric inversion. Ann. Génét., 24: 37, 1981.
4. Daniel, A.: Structural differences in pericentric inversions. Application to a model or risk of recombinants. Hum Genet., 56: 321, 1981.
5. De Grouchy, J. and Turlean, C.: Atlas des Maladies - - Chromosomiques, 2a. Ed. Expansion Scientifique Francaise, Paris, 1982. p. 426.
6. De Robertis y De Robertis, Biología Celular y Molecular, 10a. Edición. Ateneo, Buenos Aires. 1981.
7. Dharmdeo, N. S. Ph.D., Sabvro H. M.D., Henry W. Foster, M.D. A Elwyn N.G. Reproductive Performance in Women with Sex. Chromosome Mosaicism. Obstetrics and Gynecology. 55: 608, 1980.

8. Forsmann, H. and Lehmann O.: Translocation carrying phenotypically normal males and the Down Syndrome. *Lancet*, I, 1286, 1961.
9. Fujimoto, A., Wilson, M.G. and Towner, J.W.: Duplication of the segment q 12.2- qter of chromosome 22 due to paternal, inversion 22 (p13 q12.2). *Hum Genet.* - 63: 82, 1983.
10. Hassold, T.J.: A cytogenetic study of repeated spontaneous abortion. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 723, 1980.
11. Hecht, F.: Unexpected encounters in cytogenetics: repeated abortions and parental sex chromosome mosaicism may indicate risk of non disjunction. *Am. J. Hum. Genet.* 34: 145A, 1983.
12. Jalbert, P., Sele, B. and Jalbert, H.: Reciprocal - - translocations: a way to predict the mode of imbalanced segregation by pachytene diagram drawing. A study of - 151 human translocations. *Hum. Genet.*, 55: 209, 1980.
13. Kajii, T., Ferrier, A., Niikawa, N., Takahara, H., - - Ohama, K. and Avirachan, S.: Anatomic and Chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. *Hum. Genet.*, - 55: 87, 1980.
14. Lauritsen, J.G.: Aetiology of spontaneous abortions. A cytogenetic study of 288 abortuses and their parents. - *Acta obstet. Gynaec. Scand. (Suppl.)*, 52: I, 1976.
15. Lippman-Hand, A. and Vekemans, M.: Balanced translocations among couples with two or more spontaneous abortions: are males and females equally likely to be carriers? *Hum. Genet.*, 63: 252, 1983.

16. Neri, G., Serra, A., Bova, R., Natale, M.T. and Tedeschi, B.: A balanced translocation $t(4;9) (q35;q12)$ with a breakpoint within the heterocromatic region of chromosome 9 in a woman with recurrent abortion. Clin. Genet., 18: 239, 1980.
17. Neu, R.L. and Creveling, R.L.: Sex chromosome mosaicism in 25 women: a 61 percent rate of spontaneous abortion and two cases of trisomy 21. Am. J. Hum. Genet., 35: 145A, 1983.
18. Osztovcics, M.K., Toth, S.P. and Wessely, J.A.: Cytogenetic investigations in 418 couples with recurrent fetal wastage. Ann. Genet. 25: 232, 1982.
19. Penrose. L.S. Ellis, J.R. and Delhanty. J.D.A. Chromosome-translocations in mongolism and in normal relatives. Lancet, 2, 409, 1960.
20. Reinisch, L.C., Silvery, K.W.: Sex chromosome mosaicism in couples with repeated fetal loss. Am. J. Hum. Genet., 33: 117A, 1981.
21. Saura, R., Longy, M., Sautarel, M., Renouil, M. and Sandler, B.: Boule trisomie et inversion pericentrique transmise 48,XXY, + 21, inv (22). Effet interchromosomique. Ann. Génét., 26: 180, 1983.
22. Schmid, W.: A familial chromosome abnormality associated with repeated abortions. Cytogenetics. I: 199, 1962.
23. Schwartz, S. and Palmer, C.G.: Chromosomal findings in 164 couples with repeated spontaneous abortions: with special consideration to prior reproductive history. Hum. Genet., 63: 28, 1983.

24. Singh, D.N., Hara, S., Foster, H.W. and Grimes, E.M.: - Reproductive performance in women with sex chromosome - mosaicism. Obstet. Gynecol., 55: 608, 1980.
25. Stene, J. and Stengel-Rutkowski, S.: Genetic risks for - familial reciprocal translocations with special emphasis - on those leading to 9q, 10p and 12p trisomies. Ann. - Génét., 46: 41, 1982.
26. Subrt, I.: Reciprocal translocations with special refe - rence to reproductive failure. Hum. Genet., 55: 303, - 1980.
27. Summer, A.T.: A simple technique for demonstrating cen - tromeric heterocromatin. Exp. Cell Res., 75: 304, 1972.
28. Summer, A.T., Evans, H.J. and Buckland, R.: New Techni - ques for distinguishing between human chromosomes. Natu re (New Biol.) 232: 31, 1971.
29. Thompson. J.S.: Genetica Medica 2a. Ed. Salvat. Barcelo - na 1979.
30. Turleau, C., Chavin-Colin, F. and de Grouchy, J.: Cyto - genetic investigation in 413 couples with spontaneous - abortions. Eur. J. Ostet. Gynaecol. Reprod. Biol., 9: - 65, 1979.
31. Villee. C.A. Biologia, 7a. ed. Interamericana, USA. - - 1978.
32. Warburton, D. and Fraser, F.C.: Spontaneous abortion - risk in man: data from reproductive histories collected in a medical genetics unit. Am. J. Hum. Genet., 32: 549, 1980.

33. Warburton, D., Grady, V. and Jagicello, G.: The relationship of parental Chromosome anomalies to fetal karyotype in spontaneous abortions. In: Bloom, A.D. and James, L.S. (Eds.) The fetus and the newborn. Birth Defects: OAS, 17, 72, 1981.
34. Ward, B.E. Henry, P.G. and Robinson, A.: Cytogenetic studies in 100 couples with recurrent spontaneous abortions. Am. J. Hum. Genet., 32: 549, 1980.
35. Wolstenholme, J., Faed, M.J.W., Robertson, J. and Lamont, M.A.: Chromosome abnormality in couples with histories of multiple abortions. The outcome of pregnancies subsequent to ascertainment and a study of familial translocation carriers. Hum. Genet., 63: 45, 1983.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente

Número 316/85

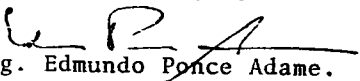
Sr. Oscar González Flores
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido --
aprobado el tema de tesis "Análisis de Aberraciones Cromosó-
micas en 334 individuos (incluyendo 144 parejas) con pérdi-
das gestacionales diversas" para obtener la Licenciatura en-
Biología, con Orientación en Biomédica.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido acep-
tada como Directora de dicha Tesis la Dra. Ma. de Lourdes --
Ramírez Dueñas.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Junio 19 de 1985.

El Director


Ing. Edmundo Ponce Adame.



FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario

Arq. Mario Patricio Castillo Paredes.

c.c.p. La C. Dra. Ma. de Lourdes Ramírez Dueñas, Directora de
Tesis.-Pte.

c.c.p. El expediente del alumno.

GUADALAJARA JAL. 25 de Noviembre de 1985


Sr. Director de la Facultad de Ciencias

Ing. Edmundo Ponce Adame:

Por medio de la presente hago constar que el Sr. Oscar Gonzalez Flores, pasante de la licenciatura en Biología de la Facultad a su digno cargo, ha cumplido con todas las observaciones y sugerencias que la suscrita le ha indicado, para la elaboración de la investigación que presenta como su tesis recepcional.

No teniendo ninguna objeción al trabajo presentado se le autoriza por mi parte la presentación de la tesis.

A T E N T A M E N T E:



Prof. María de Lourdes Ramírez Dueñas
Directora de la tesis